

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE  
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Motilita *Bacillus subtilis***  
***Bacillus subtilis motility***

Jan Tkadlec

Školitel: RNDr. Irena Lichá CSc

**2008/2009**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a pod vedením vedoucí bakalářské práce.

**Jan Tkadlec**

**Abstrakt**

Motilita je specifickým stavem bakteriální buňky indukovaným zejména nutričními podmínkami okolního prostředí. Tento stav je regulovaný pomocí transkripčních faktorů, které typicky blokují expresi příslušných genů v podmínkách, kdy by motilita nebyla výhodná. Chemotaxe je schopnost buňky reagovat na chemické stimuly. Zahrnuje signální kaskádu, která je s motilitou úzce spojená. Kolonie *Bacillus subtilis* vykazují také swarming, pohyb po pevných površích závislý zejména na produkci látky regulující tření a povrchové napětí - surfaktinu.

**Klíčová slova**

*Bacillus subtilis*, motilita, bičík, regulace, chemotaxe, swarming

**Abstract**

Motility is a specific trait of bacterial cell, primarily induced by nutritional conditions. Motility is controlled by transcriptional factors, which typically block expression of particular genes in unfavourable conditions. Chemotaxis is an ability of the cell to react to chemical stimuli from the environment. Chemotaxis is represented by signal cascade leading to movement of the cell towards or from the stimulus. Colonies of *Bacillus subtilis* also exhibit special type of social movement on the solid surface called swarming. Swarming is mainly dependent on production of surfactin, which reduce surface tension.

**Key words**

*Bacillus subtilis*, Motility, Flagellum, Regulation, Chemotaxis, Swarming.

## Obsah

1. Úvod.....	5
2. Aktivní pohyb v tekutém médiu – (swimming motility).....	7
2. 1. Morfologie bičíku .....	7
2. 2. Bičíkový motor.....	9
2. 2. 1. Bičíkový stator- Mot komplex.....	10
2. 2. 2. Bičíkový rotor a přepínací (switch) proteiny.....	11
2. 3. Geny podílející se na motilitě.....	11
2.3. 1. <i>fla/che</i> operon u <i>B. subtilis</i> - geny syntézy bičíku a chemotaxe.....	12
2. 3. 2. $\sigma^D$ -regulon, geny závislé v transkripci na sigma faktoru D.....	13
2. 4. Regulace motility.....	14
2. 4. 1. CodY Nutriční represor flagelárních genů.....	15
2. 4. 2. DegU-regulace <i>fla/che</i> operonu.....	16
2. 4. 3. RNA vazebný protein CsrA.....	17
2. 4. 4. Regulace skládání bičíku.....	17
3. Řízení pohybu u bakterií - chemotaxe (řízení pohybu v tekutém médiu).....	19
3. 1. Chemotaktická signální dráha.....	20
3. 1. 1. Chemotaktické receptory – MCP proteiny.....	21
3. 1. 2. Modulace citlivosti chemotaktických receptorů – Adaptační mechanismy.....	23
3. 1. 2. 1. Methylace.....	23
3. 1. 2. 2. Adaptační systém CheC-CheD-CheY-P.....	24
3. 1. 2. 3. Adaptační protein CheV.....	25
3. 1. 3. Kináza CheA.....	25
3. 1. 4. CheW – Protein regulující aktivitu CheA.....	26
3. 1. 5. CheY - Od CheA k přepínacím proteinům.....	26
4. Swarming (rojení) pohyb po pevných površích.....	27
4. 1. Několik mechanismu zasahujících do fenoménu swarmingu.....	27
4. 1. 1. Regulace produkce surfaktinu.....	28
4. 1. 2. <i>swrA</i> operon regulující diferenciaci buněk .....	28
4. 1. 3. Vliv chemotaktických genů na swarming.....	29
5. Závěr.....	30
6. Seznam použité literatury.....	32

## 1. Úvod

Prvotním a základním smyslem existence organismu, pokud k této otázce budeme přistupovat s přihlédnutím k dawkinsovskému pojetí evoluce, tj. teorie sobeckého genu, je přežít a rozmnožit se, předat své geny. U bakterií je rozmnožení rovno naakumulování dostatku živin, vytvoření dostatku nutných biomolekul a vyšších buněčných struktur a v konečném kroku rozdělení buňky na dvě stejné buňky dceřiné. Pro tuto základní úlohu své existence vytvořili bakterie širokou paletu životních strategií a způsobu jak se vyrovnat s nástrahami provázejícími život na Zemi a efektivně osídlit nejrůznější prostředí. Ať už se jedná o ohromnou variabilitu metabolických aktivit, schopnosti využívat nejrozmantějších zdrojů energie a stavebních látek pro tvorbu svého těla, přes různé způsoby obrany před predací a nepříznivými podmínkami, zahrnujíc tvorbu různých toxinů či ochranných obalů až po tvorbu extrémně odolných spor.

Motilita, čímž je v této práci rozuměna schopnost aktivního pohybu, rozhodně patří mezi takovéto užitečné schopnosti. Přináší organismům, které jsou ji schopné, řadu výhod, ať už protektivních, tj. možností úniku před poškozujícím působením fyzikálních a chemických faktorů nebo predátorem, tak také naopak umožňuje najít prostřednictvím chemotaxe místo s výhodnými nutričními podmínkami a také se na takové místo dostat. Tato schopnost je ale také, jak to v přírodě bývá, zaplácena energetickou náročností pohybového aparátu.

Majoritním způsobem motility bakterií je aktivní pohyb v tekutém médiu. Uskutečňován je pomocí bakteriálního bičíku, který svou rotací vytváří sílu pohánějící bakterii vpřed, obdobně jako je tomu u lodního šroubu. Dalším typem pohybu bakterií je swarming (rojení). Je uskutečňován na pevných površích prostřednictvím produkce surfaktinu, látky snižující povrchové napětí, a koordinace chování populace bakterií, která se pohybuje jako celek. *Bacillus subtilis*, který je tématem této práce, se těmito způsoby v příslušných podmínkách pohybuje.

*Bacillus subtilis* je grampozitivní druh tyčinkovité sporulující půdní bakterie. Rod *Bacillus* je hojně využíván ve farmacii při tvorbě antibiotik, ale také třeba v zemědělství při tvorbě siláže. Jedná se o úspěšný a rozšířený rod bakterií a jeho zástupce *Bacillus subtilis* je jedním z modelových organismů pro molekulární biologii stejně jako mikrobiologii.

Cílem mé práce bylo zachytit alespoň v hrubých obrysech fenomén pohyblivosti tohoto organismu a detailněji zachytit některé z jevů s ní související. Jmenovitě

nastínění problematiky aktivního bičíkového pohybu v tekutém médiu, morfologie bičíku a genetického pozadí odpovědného za schopnost motility u *Bacillus subtilis*, a také popis některých regulačních drah koordinujících odpověď bakteriální buňky na podmínky vnějšího prostředí. Další část práce jsem věnoval fenoménu chemotaxe, jakožto řízení směru pohybu bakteriální buňky, a stručné charakterizaci mechanismu její signální kaskády. Na závěr jsem zevrubně načrtnul problematiku speciálního druhu sociálního pohybu, vyskytujícího se u některých bakterií zahrnující i druh *Bacillus subtilis*, a to tzv. swarmingu, do češtiny přeložitelného jako rojení.

## 2. Aktivní pohyb v tekutém médiu – (swimming motility)

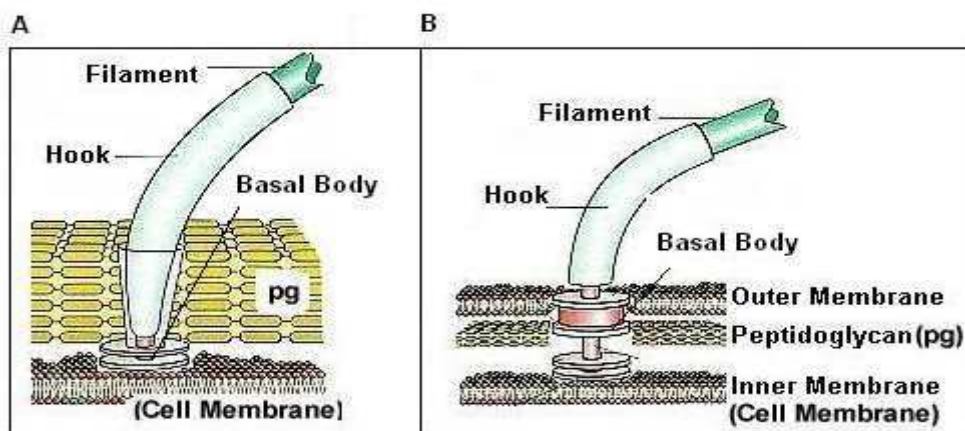
Aktivní pohyb v tekutém médiu je uskutečňován pomocí bičíků. Bičíků může být různý počet a i jejich umístění je variabilní, podle toho se rozlišuje uspořádání monotrichální s jedním bičíkem a lophotrichální s větším počtem bičíků. Lophotrichální také značí, že bičíky jsou seskupeny na určitých místech na povrchu bakterie, kdežto peritrichální rozmístění znamená výskyt bičíků po celém povrchu. Zvláštním typem je uspořádání amphitrichální, které sestává ze dvou bičíků umístěných na opačných pólech buňky.

Bičíkový pohyb je velmi efektivní dosahuje rychlosti až 0,00017 km/h, což při přepočtu na délku bakterie činí 60 délek za vteřinu. Bičík rotuje u většiny bičíkatých bakterií ve dvou módech, po a proti směru hodinových ručiček. Rotace protisměru způsobuje uspořádání bičíků do rotujícího svazku a pohyb vpřed. Rotace po směru hodinových ručiček způsobí rozvolnění svazku bičíků a tápavý pohyb zvaný tumbling.

### 2. 1. Morfologie bičíku

Bakteriální bičík je proteinový komplex obsahující více než 20 různých proteinů, vykazující schopnost samouspořádání (self-assembly). Slouží k pohybu bakterie zejména při pohybu v tekutém médiu, k čemuž je uzpůsoben. Pro swarming je ale také syntéza bičíku nezbytná.

Bičík se morfologicky skládá ze tří základních částí, a to jsou v obalu bakteriální buňky zasazené základní(bazální) tělísko (basal body) a dvě vnější struktury, háček (hook) a vlákno (filamentum) (obr. 1).



Obr. 1. Srovnání morfologie bičíku  $G^+$  (A) a  $G^-$  (B) bakterií. (převzato z <http://www.indstate.edu/thcme/micro/flagella.html>, upraveno)

Bazální tělísko gramnegativních bakterií obsahuje pět prstenců: L asociovaný s lipopolysacharidovou vrstvou, P v peptidoglykanové vrstvě, M v plasmatické membráně a S na její vnější straně ( M a S prstence jsou někdy uváděny společně jako MS prstenec) a C prstenec připojený z vnitřní strany plazmatické membrány k M prstenci. Uprostřed C prstence připojen k M prstenci je sekreční systém typu III, který se podílí na sekreci antisigmafaktoru FlgM a také flagelínového proteinu Hag. U gram pozitivních bakterií jsou přítomny jen dva prstence MS a C. Komponenty bazálního tělíska tvoří bičíkový motor.

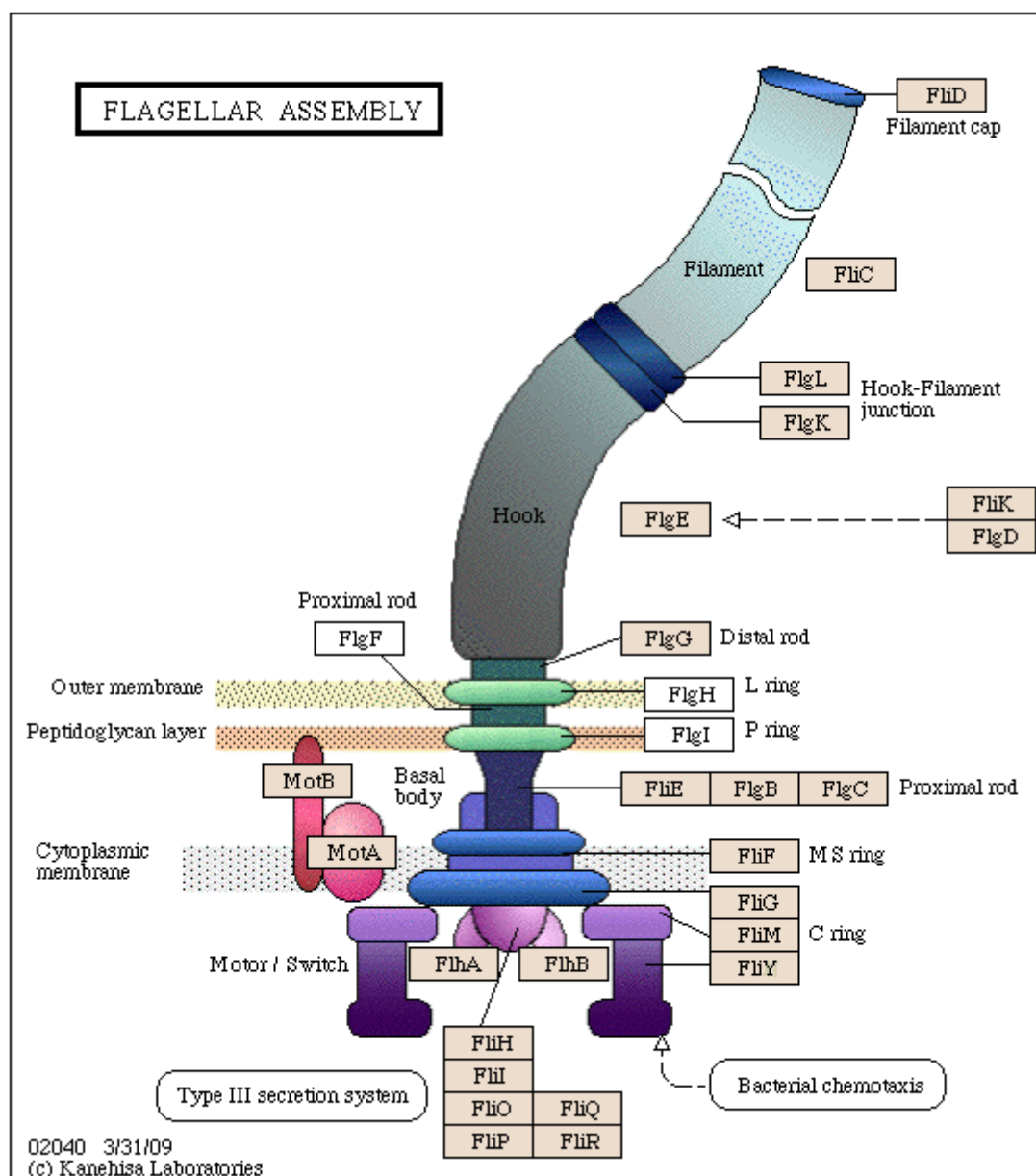
Bazální tělísko spolu s háčkem tvoří útvar zvaný HBB (Hook-and-Basal-Body) jeho středem prochází dutá trubice, na kterou navazuje duté vlákno bičíku (DePamphilis a Adler, 1971).

Háček je krátký a zahnutý, spojuje vlákno s bazálním tělískem a převádí na něj kroutivou sílu generovanou v bazálním tělísku.

Vlákno bičíku je dutá trubice tvořená z helikálně uspořádaného proteinu flagelínu, u *Bacillus subtilis* se tento protein nazývá Hag, jeho molekulární velikost je 32,6 kDa. Vlákno má asi 20 nm v průměru a délku dosahující přibližně 15-20  $\mu\text{m}$ , roste polymerizací na svém distálním konci, což závisí na exportu flagelínového proteinu skrz centrální kanál. K vnějšímu konci flagelínového vlákna jsou asociovány proteiny se stabilizační a regulační, nazývané cap-proteiny. Flagelíny jsou evolučně vysoce konzervované proteiny, jejich velikost je v rozmezí 30 až 60 kDa, neobsahují tryptofan a cystein a další aminokyseliny jako fenylalanin, tyrosin, prolin a histidin jen v malém množství.

Podrobné proteinové složení komponent bičíku viz obr. 2.





Obr. 2. Detailní struktura bakteriálního bičíku gramnegativních bakterií. Bíle jsou označený proteiny nezúčastněné na tvorbě bičíku *Bacillus subtilis*, jsou to FlgF, FlgH a FlgI proteiny tvořící L a P prstence bičíků gramnegativních bakterií. (převzato z KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>, upraveno)

## 2. 2. Bičíkový motor

Bičíkový motor je součást bazálního tělíska bičíkového aparátu, která je odpovědná za rotaci vlákna bičíku a tím i pohyb bakterie. Sestává z rotoru a statoru. Rotor představuje pohyblivou část motoru jejíž pohyb je transformován na rotaci vlákna bičíku. Rotor je tvořen MS prstencem umístěným v membráně a C prstencem, který

se nachází na vnitřní straně membrány. MS a C prstence jsou vzájemně spojeny a tvoří kompaktní útvar. Stator představuje nepohyblivou část bičíku umístěnou v membráně, která je za pohyb bičíku zodpovědná. Stator konvertuje energii elektrochemického gradientu iontů na rotaci bičíku.

### 2. 2.1. Bičikový stator – Mot komplex

Bičikový stator tvoří komplex proteinů nazývaný Mot komplex. Mot komplexy tvoří prstenec kolem bičikového rotoru a jsou zodpovědné za jeho otáčení. Sestávají ze dvou druhů proteinů. U *Bacillus subtilis* se vyskytují dva typy Mot komplexů první je tvořen proteiny MotA a MotB a druhý MotP a MotS.

MotAB komplex zprostředkuje rotaci bičíku spojenou s přesunem  $H^+$  iontů přes membránu. MotPS komplex je odpovědný za pohyb spojený s transmembránovým gradientem  $Na^+$  iontů. Hlavní determinanty iontů, které bude konkrétní Mot komplex využívat, jsou v prvním případě MotB a druhém MotS proteiny, jak nasvědčují pokusy s hybridními Mot komplexy (Ito *et al*, 2005). MotAB je odpovědný za pohyb bakterií v tekutém médiu. MotPS se zprostředkuje pohyb na nezpevněných agarrech, zvláště při zvýšené viskozitě, pH a koncentraci NaCl. Zároveň je nutné poznamenat, že MotPS nepodporuje na surfaktinu závislý swarmingový pohyb na tuhých agarrech (Ito *et al*, 2004).

Geny *motP* a *motS* je součástí operonu s genem pro CcpA, což je regulátor uhlíkového metabolismu (Moreno *et al*, 2001). Koordinovaná exprese z *ccpA-motPS* operonu by mohla reprezentovat komplexní odpověď na alkalický stres, zahrnující zvýšení  $Na^+$  závislé motility a zvýšenou metabolickou produkci kyselin v odpověď na vysoké pH okolního prostředí.

Úroveň exprese MotPS má také vliv na počet bičíků na buňku. K plnohodnotné biosyntéze bičíků je třeba obou Mot komplexů MotAB i MotPS. Regulace exprese je uskutečňována intergenovou vlásenkou mezi geny *ccpA* a *motP*, která funguje jako transkripční terminátor. Následné množství MotP a MotS proteinů spolu s proteiny MotA a MotB spoluurčuje množství bičíků na buňku. Divoký kmen má v průměru deset bičíků na buňku, mutant se zvýšenou expresí *motPS* kolem dvanácti, mutant exprimující pouze MotAB či jen MotPS sedm respektive pět a dvojitý mutant s delecí *motAB* i *motPS* jen dva bičíky na buňku. U dvojitého mutantu je i délka bičíků signifikantně kratší než u ostatních případů (Terahara *et al*, 2006).

### 2. 2. 2. Bičkový rotor a přepínací (switch) proteiny

Rotor bakteriálního bičku představuje pohyblivou část bičkového motoru. Je tvořen MS prstencem umístěným v plasmatické membráně, který je obklopen Mot komplexy, a C prstencem, který je k MS prstenci připojen na vnitřní straně membrány. MS-prstenec je tvořen proteiny FliF. FliF je přes protein FliG spojen s C prstencem tvořeným FliM. S FliM interaguje CheY-P konečný efektor chemotaktické kaskády, což pravděpodobně způsobuje přeuspořádání proteinů C-prstence a tím rotaci bičku proti směru hodinových ručiček a přímý pohyb vpřed. Efekt je zprostředkován proteinem FliG, který interaguje se statorem bakteriálního bičku (Park *et al*, 2006, Thomas *et al*, 1999).

Proteiny FliG a FliM jsou přepínací proteiny orientace rotace bičku. K přepínacím proteinům patří ještě u jiných bakterií protein FliN, ten se u *Bacillus subtilis* nevyskytuje. *Bacillus subtilis* má v přepínacím komplexu navíc protein FliY. FliY se vyskytuje u grampozitivních bakterií a některých spirochet. Je to 41 kDa velký protein, který ve své C-koncové doméně vykazuje částečnou homologii s FliM a FliN u *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium* (Bischoff a Ordal, 1992) a ve své N-koncové doméně je homologiní k fosfatázám CheC a CheX. FliY odštěpuje fosfát z CheY-P. Mutace v CheY-P vazebné doméně FliY vede k podobnému fenotypu jako u *Escherichia coli* mutace v genu fosfatázy CheZ. Rozdíl vzhledem k mechanismu hydrolýzy CheY-P u *Escherichia coli* je, že FliY je součástí komplexu přepínacích proteinů tj. součást bičku, kdežto CheZ chemotaktické kaskády (Szurmant *et al*, 2004).

### 2. 3. Geny podílející se na motilitě

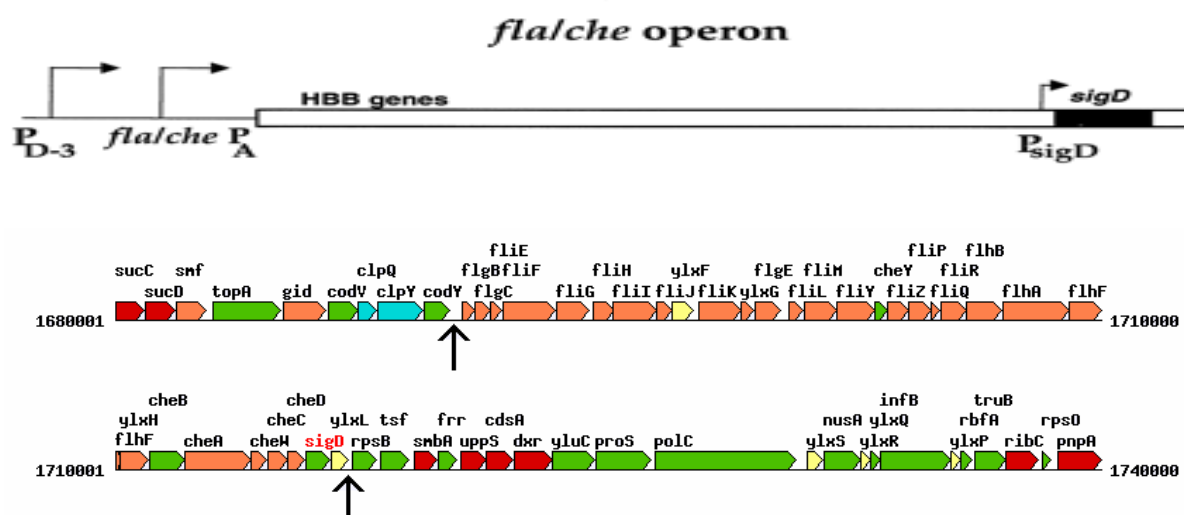
Geny zapojené do syntézy a tvorby bičku jsou organizovány do regulonů, které se u enterobakteriálních druhů, jako je *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*, člení do tří tříd. *flhDC* operon zahrnuje geny první třídy a představuje řídicí operon, je hlavním kontrolním bodem syntézy bičku. Exprese z *flhDC* závisí na mnoha faktorech mezi něž patří cytosolická koncentrace cAMP, růstová fáze, koncentrace anorganických soli, karbohydrátů nebo alkoholů. Exprese z *flhDC* je nutná k zahájení exprese genů druhé třídy, kódující komponenty sekrečního systému a proteiny základního tělíska a háčku. Ke genům druhé třídy patří také gen *fliA* kódující transkripční faktor  $\sigma^{28}$  odpovědný za expresi genu třídy třetí. Třetí třída obsahuje geny strukturních proteinů vlákna bičku, motorových a s háčkem asociovaných

proteinů a chemotaktický aparát. Exprese genů třetí třídy je závislá na dokončení HBB komplexu (Hook and Basal Body, tj základní tělisko plus bičík) a jeho schopnosti sekretovat z buňky antisigma faktor FlgM, který vyvazuje sigma faktor odpovědný za expresi genů třetí třídy (Chilcott a Hughes, 2000; review).

Na rozdíl od enterobakterií není u *Bacillus subtilis* přítomen řídicí operon odpovídající genům první třídy. Geny odpovídající druhé třídě jsou seskupeny ve *fla/che* operonu. Geny odpovídající třídě třetí, zahrnující geny pro flagelín, Mot komplexy, receptory a chemotaxi, jsou součástí regulonu, jehož transkripci řídí sigma faktor D ( $\sigma^D$ ). Regulace se rovněž účastní antisigma faktor FlgM (viz dále)

### 2.3.1. *fla/che* operon u *Bacillus subtilis*- geny syntézy bičíku a chemotaxe

*fla/che* operon (obr. 3. ) zahrnuje více než 30 genů účastnících se biosyntézy bičíku a chemotaktické kaskády, je větší než 26 kbp. Mezi geny, které obsahuje patří geny proteinů tvořících trubici procházející základním tělískem bičíku (*flgB* a *flgC*), M prstenec (*fliF*), geny přepínacích proteinů (*fliG*, *fliM* a *fliY*), proteinů účastnících se na tvorbě háčku (*fliE*, *fliK*, *flgE* a *flgG*), proteinů nutných k tvorbě a uspořádání bičíku (*fliH*, *fliJ*, *fliL*, *fliZ*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*), asociovaných s bičíkem (*flhB*, *flhA*, *flhF*), účastnících se na chemotaktické kaskádě (*cheY*, *cheB*, *cheD*, *cheC*, *cheA*, *cheW*) a gen pro transkripční faktor sigma D, který je umístěn na konci *fla/che* operonu.



obr .3. *fla/che* operon. Nahoře promotory řídící transkripci *fla/che*. Dole geny operonu a geny v jeho okolí. Začátkem operonu je gen *flgB* a konec je za genem *ylxL*. (převzato z West *et al*, 2000, a <http://bacillus.genome.jp/>)

*fla/che* operon není monocistronní. Na expresi z *fla/che* operonu se podílí nejméně tři promotory. Před operonem jsou umístěny dva, jsou to  $P_A$  a  $P_{D-3}$ , a uvnitř umístěný promotor  $P_{sigD}$ .  $P_A$  leží bezprostředně před samotným operonem, exprese z něj je řízena sigma faktorem A.  $\sigma^A$  je zodpovědný za transkripci genu v buňkách rostoucích vegetativním růstem.  $P_A$  je esenciální pro schopnost motility. Řídí přepis genů začátku operonu, které se podílejí na tvorbě HBB. HBB má sekretorickou funkci. Delece způsobuje neschopnost sekretovat antisigma faktor FlgM, což má za následek značnou redukci exprese  $\sigma^D$  závislých genů a motility.

Druhý promotor  $P_{D-3}$  leží před  $P_A$ .  $P_{D-3}$  je závislý na sigma faktoru D. Je to minoritní promotor a jeho podíl na expresi genů *fla/che* operonu není velký.

Třetí promotor  $P_{sigD}$  patří, stejně jako  $P_A$ , k  $\sigma^A$  závislým promotorům. Je umístěn uvnitř *fla/che* operonu na jeho konci před genem *sigD* kódující sigma faktor D. Pokusy s kmeny s delecí v tomto promotoru ukazují, že jeho podíl na expresi z *fla/che* operonu zejména exprese *sigD* je velmi malý. A jeho funkce není pro schopnost motility nezbytná. Předpokládá se jeho účast v expresi genů nepodílejících se na motilitě, například genů syntézy autolyzínů.

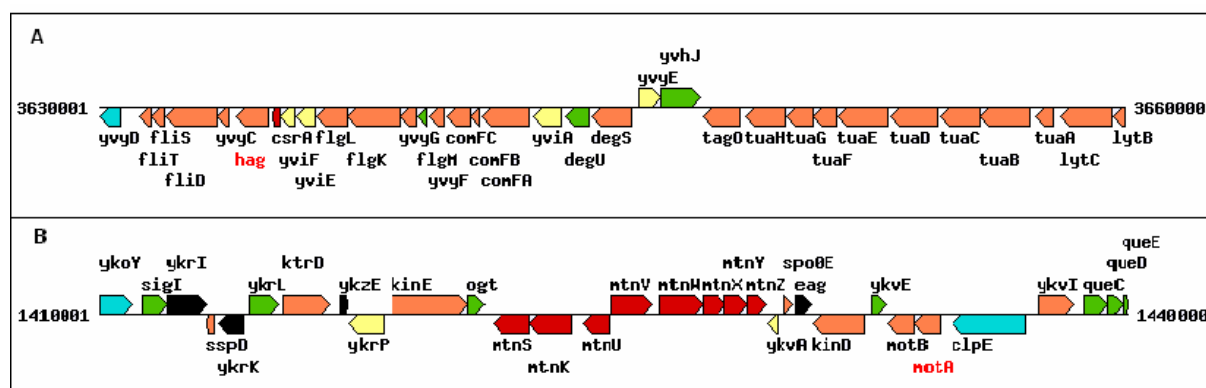
K těmto třem promotorům se předpokládá existence dalších zatím přesně neidentifikovaných promotorů. Jeden z předpokládaných promotorů je závislý na sigma faktoru A, leží uvnitř operonu a podílí se na řízení transkripce sigma faktoru D (West *et al*, 2000).

### 2. 3. 2. $\sigma^D$ -regulon, geny závislé v transkripci na sigma faktoru D

Jedná se o geny odpovídající genům třetí třídy u enterobakterií, jejich transkripce je závislá na sigma faktoru D, jehož gen je na konci *fla/che* operonu.  $\sigma^D$  řídí transkripci genů podílejících se na chemotaxi, tvorbě bičíku a syntéze autolyzínu. (Autolyzín je enzym štěpící peptidoglykan a podílejší se na přestavbě buněčné stěny bakterie). Mezi operony  $\sigma^D$ -závislých genů patří operon *fliDST*, což jsou geny bičkových proteinů, operon pro komplex proteinů motoru MotAB a také pro komplex MotPS, dále také operon zahrnující flagelínový protein Hag. V blízkosti genu *hag* je dále gen pro translační regulátor CsrA (obr. 4.).

Maximum exprese těchto genů je u bakterií na konci exponenciální fáze růstu a na začátku fáze stacionární. Exprese těchto genů je regulována přítomností antisigma faktoru FlgM. FlgM interaguje s  $\sigma^D$  formou RNA polymerázy a brání ji začít transkripci. Působení FlgM je ukončeno jeho sekrecí z buňky. Sekrece je

zprostředkovaná dokončeným funkčním komplexem HBB (Hook-an-Basal-Body). Jedná se tedy o časovou kontrolu exprese, kdy teprve po dokončení funkčního HBB, který je schopen sekrece, je odstraněním FlgM z cytoplasmy bakterie umožněná exprese  $\sigma^D$  závislých genů a tím i dokončení syntézy bičíku (Caramori *et al*, 1996). Pro plnou expresi  $\sigma^D$  závislých genů je také nutný produkt genu *ylxL* z konce *fla/che* operonu, o kterém se předpokládá, že funguje jako transkripční aktivátor. Vliv *ylxL* na pohyb v tekutém médiu ukazují pokusy, s kmeny mutovanými v tomto genu. Takové kmeny vykazují zhoršenou motilitu a sníženou úroveň exprese flagelinového proteinu Hag (Werhane *et al*, 2004).



Obr. 4. Umístění  $\sigma^D$  závislých genů. A. *fliSTD* operon a *hag*. B. *motAB* operon. (převzato z <http://bacillus.genome.jp/>)

## 2. 4. Regulace motility

Regulace je řízení odpovědi na měnící se stav vnějšího prostředí i vnitřního stavu bakterie. Má za cíl adekvátní reakci na změnu prostředí, která umožní bakterii tuto změnu přežít. Motilita je odpovědí na specifické podmínky, dané zejména obsahem živin v prostředí, a funguje jako účinný prostředek k přežití v určitém rozpětí těchto podmínek.

Schopnost motility je regulována dvěma způsoby, regulací syntézy bičíku a regulací jeho funkce.

Syntéza je regulována na úrovni transkripce a translace genů podílejících se na tvorbě bičíku a regulaci skládání bičíku. Důležitými regulátory transkripce jsou u *Bacillus subtilis* pleiotropní transkripční represory CodY a DegU. CodY potlačuje expresi genu pro tvorbu bičíku v prostředí bohatém na živiny, kde není potřeba aktivního pohybu k jejich vyhledávání. DegU brání tvorbě bičíku v chudém prostředí, jehož zdroje nejsou pro syntézu bičíku dostačující. Regulace translace je

uskutečňována RNA vazebným proteinem CsrA, blokujícím translaci flagelinového proteinu Hag. Regulace na úrovni skládání bičíku je uskutečněna jednak časovým sledem exprese proteinů tvorby bičíku a vlastnostmi jeho strukturních proteinů a také pomocí chaperonů, které regulují sekreci proteinů účastnících se tvorby bičíku. Popis těchto regulačních mechanismů je předmětem této kapitoly.

Funkce existujícího bičíku je regulována chemotaxí, která je diskutována v příslušné kapitole.

#### **2. 4. 1. CodY Nutriční represor flagelárních genů**

Mnoho procesů souvisejících s adaptací na nutriční podmínky prostředí je u *Bacillus subtilis* a dalších grampozitivních bakterií regulováno prostřednictvím CodY. Patří mezi ně kromě motility také například regulace metabolismu aminokyselin, sporulace či schopnost přirozené kompetence.

CodY je transkripční represor, brání vazbou k promotorům expresi genů. CodY funguje jako homodimér složený ze dvou 29 kDa monomerů. Vazba CodY k regulačním oblastem příslušných genů je umožněna konformační změnou v helix-turn-helix motivu C-koncové domény tohoto proteinu. Konformační změna je stimulována interakcí s GTP a rozvětvenými aminokyselinami (isoleucin, leucin a valin). GTP neslouží jako zdroj energie a jeho hydrolýza není pro interakci CodY s DNA vyžadována. Schopnost vázat GTP respektive také dGTP byla ověřena na footprint studiích. Princip footprint metody spočívá v protektivní funkci navázaného regulačního proteinu vzhledem k cílové DNA před působením DNázy I. Byly testovány i další nukleotidy, ale nevykazovaly schopnost aktivovat protektivní působení CodY. Koncentrace GTP nutná k aktivaci CodY je v řádu milimolů. Afinita CodY k GTP je tedy poměrně nízká. CodY zprostředkovaná represe genové exprese funguje v buňkách v exponenciální fázi růstu jejichž vnitřní koncentrace GTP je 2-3 mM. V buňkách vstupujících do stacionární fáze, v jejichž cytoplasmě klesá koncentrace GTP na úroveň 300  $\mu$ M, je represe uvolněna. Koncentrace GTP je snižována inhibicí syntézy guaninových nukleotidů zvýšenou koncentrací ppGTPpp. ppGTPpp vzniká v rámci stringentní odpovědi na nedostatek aminokyselin v buňce (Handke *et al*, 2008).

V případě motility, CodY reguluje expresi genů odpovědných za syntézu bičíku a jeho funkci, tj. genů *fla/che* operonu a  $\sigma^D$ -závislých genů. Blokuje jejich transkripci v prostředí bohatém na živiny (Bergara *et al*, 2003). Naopak v méně příznivém

prostředí je represe genů nezbytných pro motilitu a chemotaxi uvolněna, bičíky jsou syntetizovány a bakterie se mohou přemístit na výhodnější stanoviště, to vše ovšem za předpokladu, že se bakterie nachází sice v nepříznivém prostředí, nicméně s dostačujícími zdroji pro produkci bičíků. V příliš chudém prostředí je produkce bičíků inhibovaná pomocí DegS-DegU dvousložkového systému a naopak je podporována odpověď zahrnující produkci extracelulárních degradačních enzymů (viz kap. 2. 4. 2. ).

#### **2. 4. 2. DegU-regulace *fla/che* operonu.**

DegU je pleiotropní response regulátor. Účastní se regulace různých buněčných procesů, které fungují jako reakce na změnu vnějších podmínek. Mezi procesy regulované DegU patří tvorba biofilmu, odpověď na osmotický stres a resistance k vysoké koncentraci solí, syntéza poly- $\gamma$ (gama)-glutamové kyseliny a syntéza antibiotik. Účastní se na indukci přirozené kompetence (Hamoen *et al*, 2000). DegU se také podílí na regulaci exprese extracelulárních degradačních enzymů. Z pohledu tématu mé práce je zajímavý vliv DegU na swarming a jeho funkce jako regulátoru exprese genu *fla/che* operonu.

DegU je centrální regulátor v tvorbě bičíků a jejich skladbě. Zvýšení jeho koncentrace a i koncentrace jeho fosforylované formy vede k přechodu ze stavu pohyblivé samostatné buňky na stav přisedlé buňky tvořící biofilm. U kmenů s mutovaným genem *degU* (*degU32(Hy)*) má fosforylovaná forma DegU prodloužený poločas rozpadu. Zvýšené množství DegU-P v cytosolu má za následek zesílení produkce exoenzymů a inhibici exprese genů nezbytných pro motilitu flagelínového proteinu Hag, specifického  $\sigma^D$  faktoru a *fla/che* operonu.

DegU je cytosolický protein. Jeho působení je součástí dvousložkového systému DegS-DegU. DegS funguje jako receptorová histidin kináza a aktivuje fosforylaci DegU. Na aktivaci se podílí i další protein, a to DegQ, který při pokusech stimuloval přenos fosfátové skupiny z DegS na DegU. DegQ se účastní regulace přechodu bakteriální buňky z motilní na přisedlou růstovou fázi (Kobayashi, 2007). DegU zprostředkovaná regulace se uskutečňuje jeho fosforylovanou i nefosforylovanou formou. Exprese genů dvousložkového systému DegS-DegU je kontrolována dostupností dusíku v prostředí, při jeho nedostatku je exprese stimulována. (Yasumura *et al*, 2008).



Mechanismus regulace transkripce *fla/che* operonu pomocí DegU spočívá v afinitě fosforylované formy DegU k regionu P<sub>A</sub> promotoru tohoto operonu. DegU-P váže P<sub>A</sub> promotor a blokuje expresi *fla/che* genů a tím i expresi genu HBB a zprostředkovaně proteinů vlákna bičíku, které jsou závislé na expresi genu pro sigma faktor D situovaného na konci *fla/che* operonu. (Amati *et al*, 2004).

### 2. 4. 3. RNA vazebný protein CsrA

Regulace zprostředkovaná CsrA je další úroveň řízení syntézy bičíků. Zprostředkuje rychlé zastavení produkce bičíků v odpověď na změnu vnějších podmínek. CsrA funguje jako posttranskripční regulátor iniciace translace a regulátor stability mRNA cílového transkriptu. Mechanismus CsrA zprostředkované represe je uskutečněn mnohočetnou vazbou cílového transkriptu, přičemž je překryta Shine-dalgarno sekvence, čímž je blokována iniciace translace z daného transkriptu.

CsrA je součástí regulačního systému Csr (carbon storage regulator, tj. regulátor zásob uhlíku). Působí globálně v regulaci mnoha buněčných procesů u různých bakteriálních druhů, například regulaci glukoneogenese, metabolismu glykogenu, transportu peptidů, tvorby biofilmu a dalších. Popsány byly především u gramnegativních bakterií (Babitzke a Romeo, 2007).

Csr systém sestává z RNA vazebného proteinu (CsrA) a nejméně jedné sRNA (small RNA), která funguje jako antagonist CsrA. U *Escherichia coli* byly identifikovány dvě sRNA CsrB a CsrC, obsahující několik CsrA vazebných míst a fungují tak, že vážou tento protein a tím blokují jeho funkci.

U *Bacillus subtilis* je *csrA* posledním genem v operonu biosyntézy bičíku zahrnující gen pro flagelín Hag a jeho exprese je časově řízena spolu se sousedním genem *flhW* z  $\sigma^A$ -závislého promotoru. Exprese CsrA vrcholí hodinu po té, co buňka opouští exponenciální fázi růstu. CsrA reguluje translaci Hag, flagelínového proteinu u *Bacillus subtilis*. V leaderu transkriptu *hag* byly identifikovány dvě CsrA vazebná místa, z nichž jedno překrývá Shine-Dalgarno sekvenci a tím zabraňuje iniciaci translace proteinu Hag (Yakhnin *et al*, 2007).

### 2. 4. 4. Regulace skládání bičíku

Regulace skládání bičíku je zprostředkována z velké části již na úrovni exprese genů tvořících bičík a schopnosti samouspořádání jednotlivých komponent.

Skládání bičíku začíná insercí MS prstence do plasmatické membrány. Následuje vytvoření C prstence a aparátu sekrečního systému typu III. Po dokončení sekrečního systému je vytvořen centrální kanál a jím jsou sekretovány proteiny tvořící vnější část bičíku. Nejprve jsou sekretovány proteiny tvořící háček bičíku a po jeho dokončení jsou sekretovány proteiny tvořící vlákno bičíku.

Sekrece je spojena s regulační funkcí chaperonů sekrečního systému. Tyto chaperony v cytoplasmě vážou proteiny určené k sekreci a tvorbě vnějších bičíkových struktur a brání jejich degradaci a vnitrobuněčné agregaci. FliT představuje chaperon zprostředkující sekreci cap proteinů flagelínového vlákna. Chaperon FliS je zodpovědný za transport flagelínu Hag.

Na regulaci délky a růstu vlákna bičíku se účastní tzv. cap protein FliD, reguluje přidávání podjednotek vlákna na jeho konci a je pro tvorbu vlákna nezbytný (Chen a Helmann, 1994).

### 3. Řízení pohybu u bakterií - chemotaxe (řízení pohybu v tekutém médiu)

Chemotaxe je způsobem regulace motility na úrovni řízení funkce již existujícího bičíku. Mechanismus chemotaxe je zprostředkován přes signální kaskádu začínající receptory na membráně, jejichž citlivost je závislá na stupni metylace.

Chemotaxí se rozumí pohyb vyvolaný chemickým stimulem. Pokud je ve smyslu negativním k takovému stimulu, tj. proti směru koncentračního gradientu chemické látky, nazýváme takovou látku repelent. Pokud naopak ve smyslu pozitivní, po směru koncentračního gradientu chemické látky, je potom taková látka zvaná atraktant. Pohyb bakterie je složen ze dvou režimů. První je chaotické otáčení - tápání (tumbling), kdy se bičík otáčí po směru hodinových ručiček a dochází k přeorientování bakterie v prostoru. Druhým režimem je pohyb vpřed, plavání v určitém směru, kdy se bičík otáčí protisměru hodinových ručiček.

V prostředí bez přítomnosti atraktantu či repelentu dochází k rovnoměrnému střídání obou režimů a bakterie se pohybuje se stejnou pravděpodobností ve všech směrech. V prostředí obsahujícím atraktant či repelent je pohyb řízen změnou frekvence tápání. Tato frekvence je v homogenním prostředí zhruba  $1\text{ s}^{-1}$  a při pohybu ve směru atraktantu se snižuje na cca  $0,1\text{ s}^{-1}$ . Vnímání chemického stimulu je v čase, ne v prostoru. Bakterie reaguje na změnu koncentrace, ne na konkrétní hodnotu koncentrace. Po změně dochází k adaptaci chemotaktických receptorů na novou koncentraci, citlivost receptorové odpovědi se vrací na úroveň před stimulací, navzdory přetrvávající přítomnosti či absenci ligandu (Macnab a Koshland, 1972).

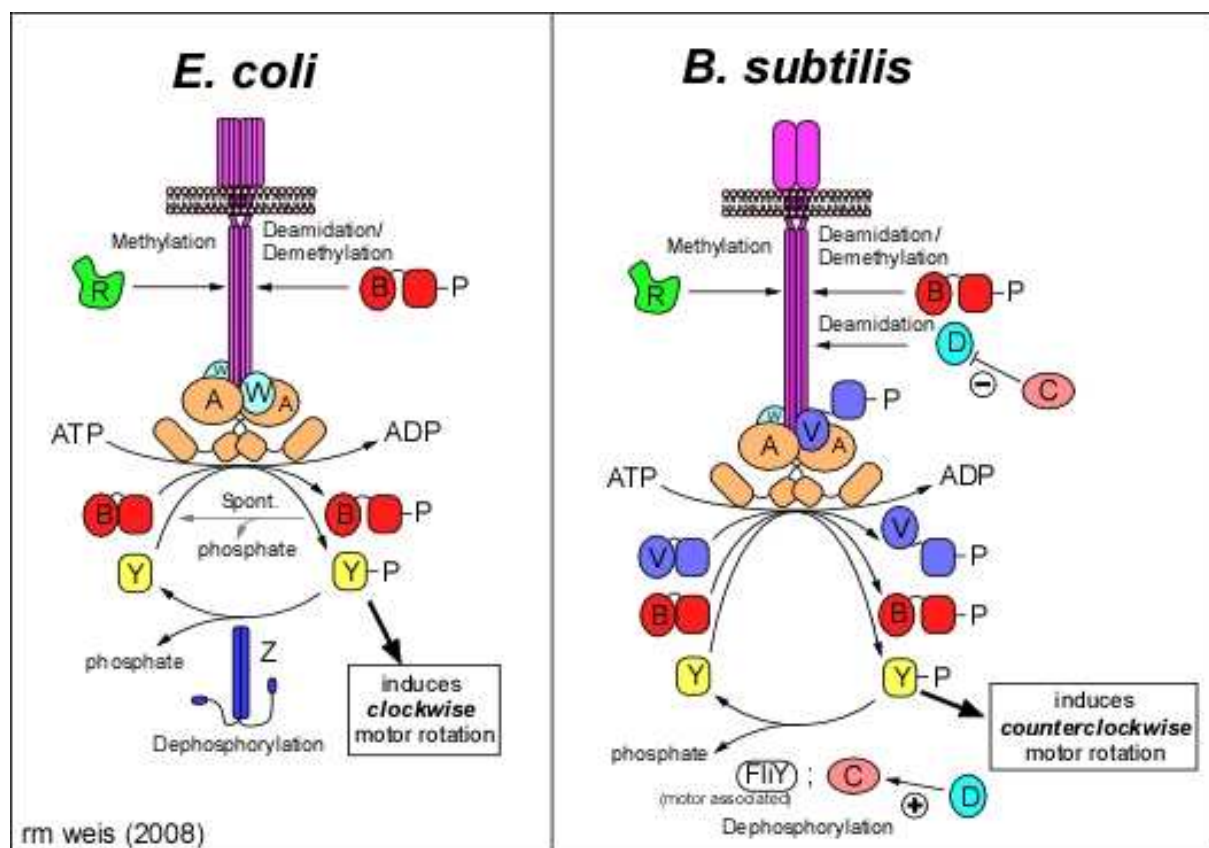
Chemotaxe je významná zvláště z hlediska nalezení prostředí s optimálními nutričními podmínkami a také jako prostředek, jak se vyhnout působení toxických látek. Tento druhý aspekt se zdá být u *Bacillus subtilis* významný, zejména proto, že jako grampozitivní bakterie postrádá protektivní vnější membránu gramnegativních druhů, především její lipopolysacharidovou složku. Včasná reakce a útěk od zdroje toxické látky je pro něj důležitou strategií pro přežití. Dokonce reaguje negativní chemotaxí i na přítomnost některých neškodných substancí a i na některé látky nově syntetizované, na které nemohl být evolučně adaptován.

Chemotaxe je více prozkoumána pro pohyb v tekutém médiu, ale i swarming je ovlivňován chemotaxí, ne ale prostřednictvím směřování raftů bakteriálních buněk, ale spíše regulací jejich vzniku (viz kap. 4. 1. 3. ).

### 3. 1. Chemotaktická signální dráha

Transdukce chemického signálu z vnějšího prostředí začíná na membráně receptorovými proteiny zvanými MCP (Methyl-accepting Chemotaxis Protein-metyl přijímající chemotaktický protein). Pokračuje přes senzorovou kinázu CheA, která se za spoluúčasti CheW a CheV autofosforyluje a dále předáním fosfátu aktivuje CheY, který působí na přepínače (switch proteiny) a způsobuje pohyb vpřed.

Důležitá je modulace citlivosti MCP receptorů. Uskutečňuje se pomocí tří adaptačních mechanismů. Adaptace pomocí metylace je prováděna metyltransferázou CheR a metylesterázou CheB. Další mechanismy jsou adaptační systém CheC-CheD-CheY-P a adaptace zprostředkovaná proteinem CheV spojujícím receptor s kinázou CheA.



Obr. 5. Srovnání mechanismu chemotaxe *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*. Písmena v obrázku představují jednotlivé proteiny chemotaktické kaskády zmiňované dále v textu.

(Převzato z Weis Laboratory website:

<http://www.chem.umass.edu/~rmweis/weislab/index.html>)

### 3. 1. 1. Chemotaktické receptory – MCP proteiny

Chemotaktické receptory odpovídají na dva typy chemických stimulů. První způsobují pozitivní chemotaxi a nazývají se atraktanty. Druhé se nazývají repelenty a způsobují chemotaxi negativní. Receptory *Bacillus subtilis* rozpoznávají jako atraktanty cukry, které jsou substrátem fosfotransferázového systému (PTS), a všechny aminokyseliny. Pro srovnání receptory *Escherichia coli* naproti tomu některé aminokyseliny rozpoznávají jako atraktanty, některé jako repelenty a některé ignorují. Jako repelenty působí široká paleta chemických látek jako jsou odpráhovače oxidativní fosforylace (FCCP fluorocarbonylcyanide-phenylhydrazone, 3, 4, 5, trichlorfenol, aj.), inhibitory transportu elektronů (kyanid sodný, amytal, aj.), a mnoho léku, jako například lokální anestetika (prokain, tetrakain, lidokain), či látky působící na nervovou soustavu (Diazepam, Phenobarbital, aj.).

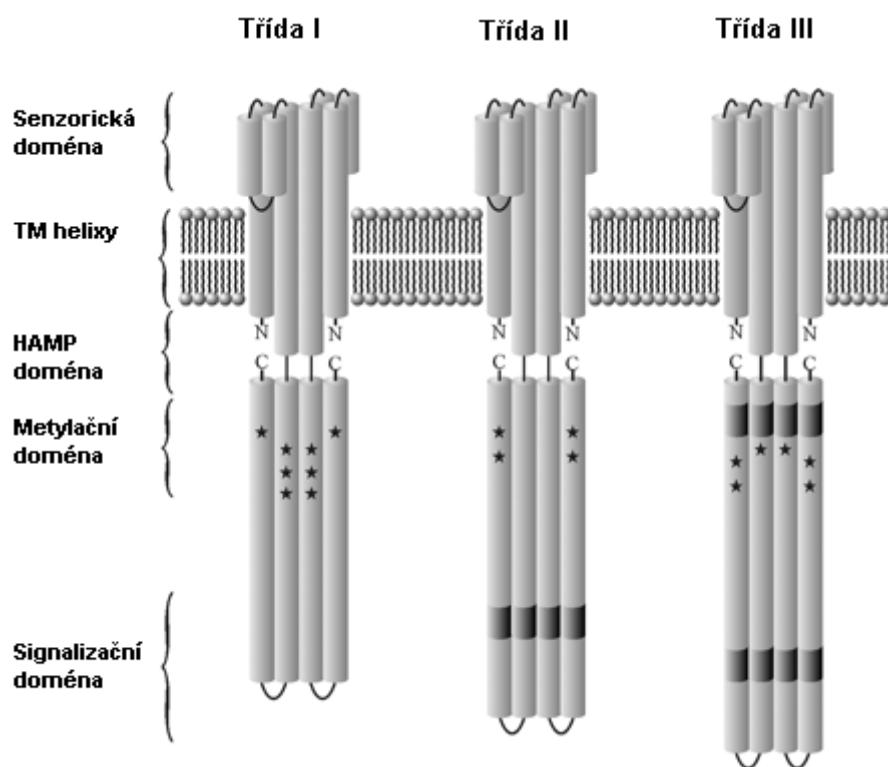
Chemotaktické receptorové proteiny se všeobecně označují jako MCP (methyl-accepting-chemotaxis protein), jde o nadrodinu receptorových proteinů. Receptory jsou transmembránové proteiny s N-koncovou periplasmatickou ligand vázající doménou (Yeh *et al*, 1996). Spojení s cytosolickou částí receptoru představuje transmembránová doména sestávající ze dvou helixů. Na transmembránovou doménu navazuje HAMP doména (histidine kinase, adenylyl cyclase, methyl-accepting chemotaxis protein, and phosphatase). HAMP doména zprostředkovává přenos konformační změny, která je způsobená navázáním ligandu na receptor, na zbytek cytoplasmatické části receptoru. C-terminální cytosolická doména obsahuje region pro metylaci na postranních řetězcích specifických glutamátů a koncový region, který asociuje s CheW, u *Bacillus subtilis* také CheV (Kim *et al*, 1999; Park *et al*, 2006).

Receptorové proteiny tvoří dimery, spojené v coiled-coil strukturu. Pokusy s technologií nanodisku naznačují, že signalizující komplex tvoří struktura vyššího řádu tvořená třemi cytosolickými částmi spojenými homodimery receptorového proteinu (Boldog *et al*, 2006). Zásadní pro funkci receptoru je jeho metylace, která ovlivňuje stabilitu coiled-coil struktury homodimerů receptorových proteinů (viz kap. 3. 2. 1. ).

Chemotaktické receptory bakterií se dělí na tři třídy (viz obr. 6. ) podle čtrnácti aminokyselinové sekvence zvané *indel*, která se vyskytuje v páru v C-terminální doméně receptorového proteinu. U třídy I nejsou indel sekvence přítomné, u třídy II jen jeden pár a u třídy III jsou dva páry. U *Bacillus subtilis* se vyskytují receptory třídy

III, stejně tak i u Archebakterií, proto se tato skupina receptoru považuje za fylogeneticky původnější, ostatní třídy jsou od ní odvozené (Le Moual a Koshland, 1996)

U *Bacillus subtilis* jsou známy tři MCP receptory, McpA, McpB a McpC. McpA je chemotaktickým receptorem glukosy a  $\alpha$ -metyl glykosidu, paleta jeho substrátů se překrývá s rozsahem substrátů, které rozpoznává receptor McpC. McpB zprostředkovává recepci zejména asparaginu, ale také dalších aminokyselin jako například histidinu, aspartátu a glutaminu. McpC je receptorem chemotaxe většiny aminokyselin vyjma asparaginu (Muller *et al*, 1997). McpC je také receptorem cukrů a cukerných alkoholů přenášených fosfotransferázovým systémem (PTS). McpC je propojen s PTS přes Enzym I, který ve fosforylované formě interaguje s receptorem a snižuje aktivitu CheA (Garrity *et al*, 1998, Kristich *et al*, 2003). Mezi chemotaktické receptory se dá zařadit i HemAT solubilní receptor homologní k myoglobínu zjišťující vnitřní koncentraci kyslíku a zprostředkující aerotaxi (Hou *et al*, 2001).



Obr. 6. Třídy receptorů: tmavé pruhy znázorňují tzn. *indel* sekvence a hvězdičky značí místa pro metylaci receptoru. (Převzato z Szurmant a Ordal, 2004)

### 3. 1. 2. Modulace citlivosti chemotaktických receptorů – Adaptační mechanismy

Adaptace - schopnost udržení citlivosti receptorů při různých koncentracích jejich stimulů je důležitou podmínkou pro fungování chemotaxe. Chemický stimul je při chemotaxi bakterií vnímán pomocí změny koncentrace. Přidání atraktantu vede k aktivaci receptoru. Receptor s navázaným atraktantem stimuluje aktivitu kinázy CheA. CheA aktivuje zbývající část kaskády směřující k přepínacím proteinům rotace bičíku, ale také zpětnovazebné adaptační mechanismy, které aktivitu CheA snižují. Adaptace je uskutečňována pomocí metylace receptoru, CheC-CheD-CheY-P systému a pomocí fosforylace proteinu CheV.

#### 3. 1. 2. 1. Metylace

Metylovány jsou postranní řetězce glutamátů C-koncové domény MCP proteinů. U receptorů přítomných u *Escherichia coli* metylace obecně zvyšuje aktivitu CheA kinázy. Vliv metylace se uplatňuje ve stabilizaci receptorového komplexu. Metylace glutamátových postranních řetězců ruší jejich vzájemné odpuzování a umožňuje vytvoření coiled-coil struktury mezi HAMP doménami jednotlivých proteinů tvořících receptorový komplex.

U *Bacillus subtilis* je situace složitější, metylace jeho receptorů je vysoce specifická a na postranních řetězcích jednotlivých glutamátů má rozdílný efekt na aktivitu CheA kinázy. Glutamát na pozici 371 receptoru McpB je demetylován při přidání atraktantu a v pozici 637 při odebrání atraktantu, glutamát na pozici 630 je demetylován v obou případech. Výsledkem demetylace je vznik metanolu (Zimmer *et al*, 2000).

Metylace funguje jako adaptace na úroveň koncentrace vnějšího stimulu a brání nasycení receptoru. U *Bacillus subtilis* je receptor rychle demetylován v odpověď na přidání atraktantu, a pomalu remetylován pokud zůstává atraktant přítomen. Stejný proces probíhá, když je atraktant odebrán. Tento způsob adaptace není u *Bacillus subtilis* jediný, narozdíl od *Escherichia coli*, u tohoto druhu je znám pouze mechanismus adaptace závislý na metylaci receptoru.

Metylace je regulována dvěma proteiny metyltransferázou CheR a metylesterázou CheB.

CheR odebírá metylovou skupinu z S-adenosylmethioninu a předává je na postranní řetězce specifických glutamátů na receptoru (Hanlon *et al*, 1993). K funkci

CheR potřebuje dvojmocné kationty (Burgess-Cassler a Ordal, 1982), nulový mutant (null mutant) u *Bacillus subtilis* je pouze tápající. (Kirsch *et al.*, 1993b).

CheB je metylesteráza. Odštěpuje metylové skupiny z postranních řetězců glutamátů MCP vytvořených CheR. CheB je aktivována pomocí fosforylace své regulační N-koncové domény aktivní fosforylovanou formou kinázy CheA-P, aktivita CheB je tedy úměrná aktivitě CheA. Demetylace (stejně jako metylace) je závislá na konformaci receptoru. CheB preferenčně demetyluje aktivní formu receptoru, CheR naopak metyluje preferenčně inaktivní konformaci (Kim *et al.*, 2001). Metylace usnadňuje navázání ligandu a změny touto vazbou vyvolané (Boldog *et al.*, 2006, Alon *et al.*, 1999).

### 3. 1. 2. 2. Adaptační systém CheC-CheD-CheY-P

CheD a CheC jsou proteiny specifické pro chemotaktickou signální kaskádu *Bacillus subtilis* a u *Escherichia coli* se nevyskytují. Představují další mechanismus adaptace citlivosti MCP receptorů, který ale v detailech není zcela objasněn.

CheD funguje jako receptorová deamináza, konvertuje glutaminy na glutamáty, zastává tedy funkci, kterou u *Escherichia coli* plní metylesteráza CheB, deaminace receptoru je nutná pro efektivní transdukci signálu a aktivaci kinázy CheA (Kristich a Ordal, 2002).

CheC je fosfatáza, jejím substrátem je CheY-P (Szurmant *et al.*, 2004), nicméně nulový mutant v CheC nevykazuje zvýšené množství CheY-P, jak je tomu například v případě nulového mutantu v genu pro fosfatázu CheZ u *Escherichia coli*, tato fosfatáza není u *Bacillus subtilis* přítomná. I s přihlédnutím k schopnosti přepínacího proteinu FliY defosforylovat CheY je významnějším faktem, že mutant není schopen plné adaptace (Kirby *et al.*, 2001). CheC má kromě fosfatázové aktivity také schopnost vázat CheY-P i CheD (Rosario a Ordal, 1996). Mutační analýzy naznačují, že právě interakce CheC-CheD je pro mechanismus adaptace zásadní, ne fosfatázová aktivita CheC (Szurmant *et al.*, 2004; Muff a Ordal, 2007, Chao *et al.*, 2006). Afinita CheC k CheD je zvýšená přítomností CheY-P. Vazba CheC-CheD zvyšuje fosfatázovou aktivitu CheC. Na základě těchto údajů se předpokládá model zpětnovazebné regulace zahrnující CheY-P.

Před působením atraktantu je část CheD navázána na receptor. Přidání atraktantu způsobí aktivaci CheA, což vede k zvýšení koncentrace CheY-P. Dochází k interakci CheY-P s CheC a tento komplex pravděpodobně vyvazuje CheD z vazby na



receptor, a tím snižuje aktivitu CheA. Odebrání atraktantu či přidání repelentu naopak vede ke snížení aktivity CheA, což vede poklesu koncentrace CheY-P. Úbytek CheY-P vede k rozpadu komplexů s CheC-CheD-CheY-P, tím vzroste množství volného CheD, který může vázat receptor a reaktivovat jej. Jiný model předpokládá že aktivace receptoru způsobuje disociaci CheD z vazby k receptoru. Volný CheD poté interakci s CheC zvyšuje jeho fosfatázovou aktivitu a tím reguluje množství CheY-P. Proti této hypotéze ovšem stojí fakt, že mutantní kmeny s defektní fosfatázovou aktivitou CheC jsou schopné adaptace, což ale nemusí znamenat, že se tento mechanismus na adaptaci nepodílí (Muff a Ordal, 2007).

### 3. 1. 2. 3. Adaptační protein CheV

Podobně jako CheW se CheV účastní na propojení receptoru s kinázou CheA. CheV se vyskytuje u mnoha eubakterií, například *Salmonella typhimurium*, a u druhu blízkých *Escherichia coli*, ne však přímo u tohoto druhu a také u žádné archebakterie. C-koncová regulační doména CheV u *Bacillus subtilis* obsahuje vysoce konzervované aspartáty jejichž postranní řetězce, které jsou fosforylovány kinázou CheA (Fredrick a Helmann, 1994). Funkčně je CheV redundantní k CheW ve smyslu, že jednotliví nuloví mutanti jsou nadále schopni adaptace i vnímání gradientu, ale hůře než divoký typ. CheV je součástí jednoho ze tří adaptačních systémů u *Bacillus subtilis*. Aktivovaná kináza CheA fosforyluje CheV, což vede k zpětnovazebné inhibici kinázové aktivity CheA. CheV-P pravděpodobně ruší vazbu mezi ligand vázajícím receptorem a CheA.

### 3. 1. 3. Kináza CheA

CheA je histidinová kináza schopná autofosforylace. K fosforylaci využívá fosfát z ATP (Hess *et al*, 1988). CheA je cytosolický 74 kDa velký protein, který má v sekvenci aminokyselin 34% shodu s homologním CheA *Escherichia coli*. U *Bacillus subtilis* nulový mutant v *cheA* vykazuje zvýšenou četnost tápání (tumbling) (Fuhrer a Ordal, 1991). *Bacillus subtilis* se vyskytuje jen v jedné formě na rozdíl od *Escherichia coli*, u které existuje krom plně funkční dlouhé formy proteinu i kratší cca 65 kDa forma, která není schopná autofosforylace (Wolfe *et al*, 1994). Fosforylace a tím i aktivita závisí na konformaci udělované vazbou s receptorem. Vazba atraktantu na receptor zvyšuje aktivitu CheA (Borkovich *et al*, 1989), což v důsledku vede k pohybu

vpřed (Garritty a Ordal, 1997). Fosfátovou skupinu kináza předává na CheY, protein interagující s přepínacími proteiny směru rotace bičíkového motoru.

Oba proteiny CheA i CheY jsou nezbytné pro pohyb vpřed, jako odpověď na přítomnost chemického stimulu. K aktivaci CheA jsou nutné dva proteiny CheW a CheV na rozdíl od *Escherichia coli*, kde stačí pouze CheW.

#### **3. 1. 4. CheW – Protein regulující aktivitu CheA**

CheW spojuje receptor s kinázou CheA a zprostředkuje aktivaci kinázy v odpověď na vazbu ligandu na receptor. CheW je protein velký 17 kDa vykazující 29% aminokyselinovou shodu s homologním CheW u *Escherichia coli*. *cheW*<sup>-</sup> mutant vykazuje po přidání atraktantu či repelentu přechodný pohyb vpřed či tápání, nicméně její schopnost chemotaxe je značně zhoršená (Hanlon *et al* 1992).

#### **3. 1. 5. CheY - Od CheA k přepínacím proteinům**

CheY je konečným efektozem chemotaktické kaskády. CheY je fosforylováno na postranních řetězcích aspartátu Asp54 aktivní formou CheA. Fosforylovaná forma CheY interaguje s přepínacími proteiny směru rotace bičíku a tím mění chování bakterie (Eisenbach, 1996), konkrétně s CheY-P interaguje protein FliM (Toker a Macnab, 1997). Nulový mutant u *Escherichia coli* vykazuje výlučně přímý pohyb, kdežto u *Bacillus subtilis* vykazuje neustálé tápání (Bischoff a Ordal, 1991). CheY-P (fosforylovaná forma) je signál pro pohyb vpřed u *Bacillus subtilis* a tápání u *Escherichia coli*. U *Bacillus subtilis* se také účastní na CheC-CheD-CheY-P adaptačním systému (viz kap. 3. 1. 2. 2. ). Zdá se navíc, že se CheY účastní i na metylaci, neboť nulový mutant *cheY* není schopná remetylace po přidání atraktantu.

#### **4. Swarming (rojení) pohyb po pevných površích**

Swarming je speciálním druhem pohybu po pevných površích, kterého jsou schopné bičíkaté bakterie. Na rozdíl od bičíkového pohybu v tekutém médiu, kterým se pohybují jednotlivé bakterie, je swarming multicelulárním pohybem. Swarming je uskutečňován pomocí spojení bakterií do multicelulárních raftů. Swarming slouží k rychlé kolonizaci nových stanovišť při růstu na pevném podkladu. Setkáváme se s ním u různých druhů gramnegativních i pozitivních bakterií. Jedná se o podstatnou, nicméně vratnou změnu v chování a morfologii bakterie v odpověď na podmínky prostředí.

Stejně jako pohyb v tekutém médiu je swarming závislý na produkci funkčních bičíků, ale také na dalších faktorech, zejména produkci lipopeptidu surfaktinu, látky snižující povrchové napětí a tření (Kearns a Losick, 2003). Faktory, určující zda se populace bakterií začne pohybovat pomocí swarmingu, jsou nejen působení vnějších stimulů a vnitřní fyziologické parametry bakterií, ale i mezibuněčný kontakt bakterií a kontakt s pevným povrchem.

Bakterie pohybující se swarmingem mají obvykle zvýšený počet bičíků na buňku. Tyto buňky pak vytvářejí multicelulární raft, který se koordinovaně pohybuje. Kolonie bakterií šířících se swarmingem jsou velké s místy větší koncentrace bakterií až terasovitým vzhledem (Rauprich *et al*, 1996). Přesná morfologie kolonií se může podle konkrétních nutričních podmínek značně lišit, od kolonií připomínajících řídké větve po kolonie tvořící koncentrické kruhy. Dva základní faktory určující morfologii kolonií jsou tuhost média určená koncentrací agaru a jeho nutriční složení (Badoual *et al*, 2009, Kearns a Losick, 2003).

Swarming se podílí také na patogenicitě bakterií schopností bakterií kolonizovat povrch tkání, například vylučovacího traktu či tvorbou biofilmů na katetrech, a zmnožení bičíků vyvolává silnou imunitní odpověď, jelikož flagelín je rozpoznáván jako antigen.

##### **4. 1. Několik mechanismů zasahujících do fenoménu swarmingu**

Zde kvůli rozsahu práce a z části i neprobádanosti tohoto fenoménu není možné v plné šíři nastínit problematiku swarmingu, a proto jsem se uchýlil k zachycení jen některých vybraných poznatků.

#### 4. 1. 1. Regulace produkce surfaktinu

Surfaktin je velmi účinný surfaktant, povrchově aktivní látka snižující povrchové napětí. Tato vlastnost je pravděpodobně jeho určující funkcí při tomto druhu pohybu, neboť bylo prokázáno, že surfaktin je pro swarming nezbytný. Jedná se o neribosomálně vyráběný cyklický lipopeptid, jeho produkce je řízena proteiny z operonu jeho syntézy *srf*. Tento operon zahrnuje geny pro proteiny surfaktin syntetázy. Surfaktin syntetáza je multienzymový komplex jeho podjednotky tvoří čtyři proteiny SrfAA, SrfAB, SrfAC a SrfAD (Vollenbroich *et al*, 1994). Na syntéze se také účastní phosphopantetheinyl transferáza, kódovaná genem *sfp*, který není součástí *srf* operonu, ale je v jeho blízkosti.

Transkripce z *srf* operonu je řízená transkripčním faktorem ComA. Na jeho aktivaci se podílí histidin kináza ComP a také signální feromon ComX (Gaisser a Hughes, 1997; Magnuson, 1994).

V funkce surfaktinu je také závislá na schopnosti bakterie jej transportovat ven z buňky. Export surfaktinu obstarává pravděpodobně více mechanismů jeden z nich je závislý na funkci exportéru SwrC. SwrC je protein, který funguje jako membránová pumpa, je členem rodiny AcrB podobných proteinů, což jsou pumpy odstraňující z buněk škodliviny (AcrB-like family of multidrug resistance pump). Tato skupina proteinů byla nazvána podle AcrB, který je hlavním exportérem tohoto typu u *Escherichia coli* (Murakami, 2002). Substrátem SwrC je široké spektrum hydrofobních látek, mezi nimi také surfaktin, tím přispívá také k resistenci proti jeho antibakteriálnímu působení (Tsuge *et al*, 2001).

#### 4. 1. 2. *swrA* operon regulující diferenciaci buněk

*swrA* je dicistronní operon kontrolující diferenciaci buněk v rámci swarmingu i pohybu v tekutém médiu. Operon je tvořen dvěma geny *swrAA* a *swrAB* (Calvio *et al*, 2005).

SwrAA je zodpovědný za regulaci exprese *fla/che* operonu. Působí jako zesilovač exprese *fla/che* při přechodu na swarming. SwrAB se podílí na regulaci diferenciace buněk. Transkripce *swrA* operonu je řízena ze dvou promotorů,  $\sigma^D$ - a  $\sigma^A$ -závislého. Pro transkripci je nutný regulátor DegU a to jeho fosforylovaná forma. A dále je v regulaci důležitý kontakt s pevným povrchem, mechanismus této regulace není zatím zcela objasněn (Calvio *et al*, 2008).

Nedomestikované kmeny *Bacillus subtilis* vykazují robustní swarming, ale laboratorní kmeny jsou relativně nepohyblivé po pevném povrchu, příčinou je mutace v genu pro syntézu surfaktinu *sfp*, a pravděpodobně i v dalších genech. Známa je frame-shift mutace v genu *swrAA* (v původní práci jako *swrA*, revidováno Calvio *et al*, 2005). Po nápravě mutací v *swrAA* a v *sfp* vykazovaly laboratorní kmeny stejně robustní swarming jako nedomestikované kmeny (Kearns *et al*, 2004).

#### **4. 1. 3. Vliv chemotaktických genů na swarming**

Na swarming mají vliv i geny zapojené do chemotaxe, ale spíše než v směřování pohybu bakterií, tak v regulaci tápání jednotlivých buněk, což má vliv na vytvoření stabilních raftů bakterií, pomocí nichž se swarming uskutečňuje. Výraznou deficienci ve schopnosti pohybovat se pomocí swarmingu vykazovaly zejména bakterie mutované v genech *cheW*, *cheV*, *cheA* a *cheY*, jde o geny, jejichž funkcí je regulace tápání. Mutace v jiných genech nevykazovaly signifikantní rozdíl vzhledem k divokému kmeni (Kearns an Losick, 2003). V pozdějších pokusech bylo zjištěno, že inzerční mutace genů *cheD* a *cheC* mají na swarming vliv, ale jedná se spíše o efekt na expresi blízkého genu *sigD* transkripčního faktoru sigma D, než o jejich přímé zapojení v tomto fenoménu (Kearns *et al*, 2004).

## 5. Závěr

Motilita se dá charakterizovat jako stav buňky vyvolaný specifickými podmínkami prostředí. Bakterie dokáží přecházet v určitém rozmezí podmínek, ve kterých jsou schopny přežívat, mezi fyziologickými stavy, které se podstatně liší ve svém fenotypu, a to jak v buněčných a metabolických procesech, tak i v morfologii buňky. Bičíková motilita je charakteristická pro prostředí, které je poměrně chudé na živiny. V nutričně bohatém médiu působí regulačně transkripční represor CodY, který blokuje syntézu bičíků. V prostředí chudším na živiny je jím zprostředkovaná represe vypnuta. Pokud toto prostředí obsahuje dostatek zdrojů pro poměrně energeticky náročnou tvorbu bičíků, je jejich syntéza spuštěna. Pokud tomu tak není je exprese genů nutných pro motilitu blokována represorem DegU.

Pro rychlé zastavení syntézy bičíků, zejména syntézy flagelínu, které jsou kvůli nutnosti opravy poškozených bičíku exprimovány neustále, funguje při změně vnějších podmínek na úrovni translace regulátor CsrA, který váže mRNA pro flagelínový protein Hag a brání jeho translaci.

Složitost bakteriálního bičíku jako funkčního celku a jeho domnělá neredukovatelnost bez ztráty funkce je uváděna kreacionisty a odpůrci evoluční teorie, co by příklad neredukovatelné komplexity a argument proti vývoji života evolucí (blíže M. J. Behe: Darwinova černá skříňka, Návrat domů 2001). Domnívám se, že tento kreacionistický argument bude díky novým poznatkům vývoje této bakteriální organely v brzkou vyvrácen. Podobnost bičíkového aparátu se sekrečním systémem typu III je patrná už dnes, a sekrece je předpokládána původní funkce bičíku. Dále jsou nacházeny homologie mezi proteiny bičíku a proteiny jiných struktur, například strukturní homologie mezi FliG, proteinem bičíkového statoru, a MgtE, transportérem hořčiku. Věřím že nové poznatky povedou k dalšímu rozkrytí evolučních mechanismů a podpoření evoluční teorie.

Chemotaxe je podstatné vylepšení schopnosti pohybu. Ve srovnání s *Escherichia coli* a obecně gramnegativními druhy je chemotaktická kaskáda *Bacillus subtilis* poměrně složitější a evolučně původnější svou podobou k Archebakteriální chemotaxi. Při regulaci citlivosti vzniká metanol, u *Escherichia coli* vzniká jen v případě přidání repelentu či odebrání atraktantu, kdežto u *Bacillus subtilis* vzniká při přidání i odebrání jak repelentu tak atraktantu. Podobně jako u *Bacillus subtilis* je tomu i u zástupce Archea *Halobacterium halobium*, jeví se tedy mechanismus chemotaxe *Bacillus subtilis* vzhledem k *Escherichia coli* jako původnější. U *Bacillus*

*subtilis* zastává chemotaxe důležitější funkci zejména z hlediska ochrany buňky, což odráží funkci lipopolysacharidu a vnější membrány gramnegativních bakterií jako účinné bariéry proti vnějším toxinům. *Bacillus subtilis* zjevně i kvůli absenci této účinné obrany je nucen více spoléhat na schopnost zaznamenat toxin v prostředí a dostat se z místa jeho působení. Často má tato strategie i preventivní funkci a *Bacillus subtilis* reaguje negativní chemotaxí i na zdánlivě neškodné látky.

Klíčovou úlohu v regulaci chemotaktické kaskády, pomineme-li přímo její efektorové součásti tj. receptorové proteiny, kinázu CheA, CheY klíčový protein spojující vnímání chemického stimulu se změnou v režimu pohybu a přepínací proteiny, mají proteiny zprostředkující adaptaci chemotaktické kaskády na koncentraci stimulujících látek, i tyto mechanismy jsou u *Bacillus subtilis* poměrně komplikovanější vzhledem k *Escherichia coli*, která používá pouze mechanismus metylace a demethylace receptoru.

U *Bacillus subtilis* se na adaptaci podílí tři mechanismy, jedním z nich je specifická metylace receptoru. Dalším mechanismem je CheC-CheD-CheY-P systém. Mechanismus jeho působení zahrnuje interakci CheD s receptorovým proteinem, tato interakce vede ke zvýšení aktivity kinázy CheA. Aktivovaná kináza CheA zvýší cytosolickou koncentraci CheY-P. CheY-P je vázán proteinem CheC, a komplex CheC-CheY-P vyvazuje CheD z vazby na receptor. Třetí mechanismus využívá fosforylace proteinu CheV spojujícího receptor s kinázou CheA.

Všechny tyto mechanismy spolu vyladují stav chemotaktické kaskády do optima, ve kterém je bakterie schopna co nejefektivněji reagovat na změny v koncentraci vnějších stimulů. Chemotaxe je modelovým případem signální kaskády a jako takové je její výzkum poměrně intenzivní. Nicméně přes docela dobré pochopení chemotaxe, čekají konkrétní mechanismy na své vysvětlení respektive zpřesnění.

Posledním tématem mé práce byl swarming. Swarming je varianta bičíkového pohybu, který je na rozdíl od aktivního pohybu v tekutém médiu uskutečňován pomocí multicelulárních raftů. Absolutně nezbytná je pro bakterie pohybující se swarmingem produkce surfaktinu, látky snižující povrchové napětí. Swarming je v mnoha ohledech neprozkoumaný fenomén, co se týká pochopení mechanismů regulace diferenciace a koordinace chování populace buněk. Porozumění těmto mechanismům může vést k pokroku i v jiných oblastech jako je vývojová biologie a rovněž evoluční biologie. Z hlediska užitečnosti pro člověka je zajímavá

potenciální možnost zasahovat do vytváření biofilmů patogeních bakterií, a tím inhibovat jejich destruktivní a toxické působení.

## 6. Seznam literatury:

**Alon, U., Surette, M. G., Barkai, N., & Leibler, S.,** (1999). Robustness in bacterial chemotaxis, *Nature* 397, pp. 168–171.

**Amati, G. A., P. Bisicchia, and A. Galizzi** (2004). DegU-P represses expression of the motility *fla-che* operon in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186:6003-6014.

**Babitzke, P., and Romeo, T.,** (2007). CsrB sRNA family: Sequestration of RNA-binding regulatory proteins, *Curr. Opin. Microbiol.* 10, pp. 156–163.

**Badoual, M., P. Derbez, M. Aubert and B. Grammaticos** (2009) Simulating the migration and growth patterns of *Bacillus subtilis* *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 388 (4), pp. 549-559

**Bergara, F., Ibarra, C., Iwamasa, J., Patarroyo, J. C., Aguilera, R., and Marquez-Magana, L. M** (2003). CodY Is a Nutritional Repressor of Flagellar Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 185, 3118–3126

**Bischoff, D. S., and G. W. Ordal.** (1991). Sequence and characterization of *Bacillus subtilis* CheB, a homolog of *Escherichia coli* CheY, and its role in a different mechanism of chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 266:12301-12305.

**Bischoff, D. S., and G. W. Ordal** (1992). Identification and characterization of FlhY, a novel component of the *Bacillus subtilis* flagellar switch complex. *Mol. Microbiol.* 6:2715-2723.

**Boldog, T., S. Grimme, M. Li, S. G. Sligar and G. L. Hazelbauer.** (2006)., Nanodiscs separate chemoreceptor oligomeric states and reveal their signaling properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, pp. 11509–11514.



**Borkovich, K. A., N. Kaplan, J. F. Hess, and M. I. Simon.** (1989). Transmembrane signal transduction in bacterial chemotaxis involves ligand-dependent activation of phosphate group transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1208-1212

**Burgess-Cassler, A., and G. W. Ordal.** (1982). Functional homology of *Bacillus subtilis* methyltransferase II and *Escherichia coli* CheR protein. *J. Biol. Chem.* 257:12835-12838.

**Calvio, C., F. Celandroni, E. Ghelardi, G. Amati, S. Salvetti, F. Cecilian, A. Galizzi, and S. Senesi** (2005). Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *J. Bacteriol.* 187:5356-5366.

**Calvio, C., Osera, C., Amati, G., Galizzi, A.** (2008). Autoregulation of *swrAA* and Motility in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 190: 5720-5728

**Caramori, T., D. Barailla, C. Nessi, L. Sacchi, and A. Galizzi** (1996). Role of FlgM in  $\sigma^D$ -dependent gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178:3113-3118.

**Chao, X., T. J. Muff, S.-Y. Park, S. Zhang, A. M. Pollard, G. W. Ordal, A. M. Bilwes and B. R. Crane** (2006)., A receptor-modifying deamidase in complex with a signaling phosphatase reveals reciprocal regulation, *Cell* 124, pp. 561–571.

**Chen, L., a Helmann, J. D.** (1994). The *Bacillus subtilis*  $\sigma^D$  –Dependent Operon Encoding the Flagellar Proteins FliD, FliS and FliT, *Journal of Bacteriology*, vol. 176, No.11, 3093-3101.

**Chilcott, G. S., and K. T. Hughes.** (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:694-708 (REVIEW).

**DePamphilis M. L., a J. Adler.** (1971). Fine Structure and Isolation of the Hook-Basal Body Complex of Flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 105(1): 384-395

**Eisenbach, M.,** (1996). Control of bacterial chemotaxis, *Mol. Microbiol.* 20, pp. 903–910.

**Fredrick, K. L., and J. D. Helmann.** 1994. Dual chemotaxis signaling pathways in *Bacillus subtilis*: a sigma D-dependent gene encodes a novel protein with both CheW and CheY homologous domains. *J. Bacteriol.* 176:2727-2735.

**Fuhrer, D. K., and G. W. Ordal** (1991). *Bacillus subtilis* CheN, a homolog of CheA, the central regulator of chemotaxis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:7443-7448.

**Gaisser, S. and C. Hughes,** (1997) A locus coding for putative non-ribosomal peptide/polyketide synthase functions is mutated in a swarming defective *Proteus mirabilis* strain. *Mol Gen Genet* 253 pp. 415–427.

**Garrity, L. F., and G. W. Ordal** (1997). Activation of the CheA kinase by asparagine in *Bacillus subtilis* chemotaxis. *Microbiology* 143:2945-2951.

**Garrity, L. F., S. L. Schiel, R. Merrill, J. Reizer, M. H. Saier, Jr., and G. W. Ordal** (1998). Unique regulation of carbohydrate chemotaxis in *Bacillus subtilis* by the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein McpC. *J. Bacteriol.* 180:4475-4480.

**Hamoen, L. W., A. F. Van Werkhoven, G. Venema, and D. Dubnau.** (2000). The pleiotropic response regulator *DegU* functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9246-9251.

**Handke, L. D., R. P. Shivers, and A. L. Sonenshein** (2008). Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP. *J. Bacteriol.* 190:798-806.

**Hanlon DW, Marquez-Magana LM, Carpenter PB, Chamberlin MJ, Ordal GW** (1992) Sequence and characterization of *Bacillus subtilis* CheW. *J Biol Chem* 267:12055-60

**Hanlon, D. W., C. Ying, and G. W. Ordal.** (1993). Purification and reconstitution of the methyl-accepting chemotaxis proteins from *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1158:345-351.

**Hess, J. F., K. Oosawa, N. Kaplan, and M. I. Simon** (1987). Protein phosphorylation is involved in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 84, pp. 7609-7613

**Hou, S., T. Freitas, R. W. Larsen, M. Piatibratov, V. Sivozhelezov, A. Yamamoto, E. A. Meleshkevitch, M. Zimmer, G. W. Ordal, and M. Alam** (2001). Globin-coupled sensors: a class of heme-containing sensors in *Archaea* and *Bacteria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:9353-9358.

**Ito, M., D. B. Hicks, T. M. Henkin, A. A. Guffanti, B. Powers, L. Zvi, K. Uematsu, and T. A. Krulwich** (2004). MotPS is the stator-force generator for motility of alkaliphilic *Bacillus* and its homologue is a second functional Mot in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 53:1035-1049.

**Ito, M., N. Terahara, S. Fujinami, and T. A. Krulwich.** (2005). Properties of motility in *Bacillus subtilis* powered by the H<sup>+</sup>-coupled MotAB flagellar stator, Na<sup>+</sup>-coupled MotPS or hybrid stators MotAS or MotPB. *J. Mol. Biol.* 352:396-408.

**Kearns, D. B., and Losick, R.** (2003) Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 49: 581–590

**Kearns, D. B., F. Chu, R. Rudner and R. Losick** (2004). Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Mol Microbiol* 52: 357–369.

**Kim, C., M. Jackson, R. Lux, and S. Khan.** (2001). Determinants of chemotactic signal amplification in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 307:119-135.

**Kim, K. K., H. Yokota, and S. H. Kim.** (1999). Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature* 400:787-792.

**Kirby, J.R., M. M. Saulmon, C. J. Kristich and G. W. Ordal** (1999)., CheY-dependent methylation of the asparagine receptor, McpB, during chemotaxis in *Bacillus subtilis*, *J. Biol. Chem.* 274, pp. 11092–11100.

**Kirby, J.R., C. J. Kristich, M. M. Saulmon, M. A. Zimmer, L. F. Garrity, I. B. Zhulin, G. W. Ordal** (2001). CheC is related to the family of flagellar switch proteins and acts independently from CheD to control chemotaxis in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.* 42, pp. 573–585.

**Kirsch, M. L., P. D. Peters, D. W. Hanlon, J. R. Kirby, and G. W. Ordal.** (1993a). Chemotactic methyltransferase promotes adaptation to high concentrations of attractant in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 268:18610-18616.

**Kirsch, M. L., A. R. Zuberi, D. Henner, P. D. Peters, M. A. Yazdi, and G. W. Ordal.** (1993b). Chemotactic methyltransferase promotes adaptation to repellents in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 268:25350-25356.

**Kobayashi, K.** (2007). Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 66:395-409.

**Kristich, C.J., and G.W. Ordal** (2002). *Bacillus subtilis* CheD is a chemoreceptor modification enzyme required for chemotaxis, *J. Biol. Chem.* 277, pp. 25356–25362.

**Kristich, C. J., G. D. Glekas, and G. W. Ordal** (2003). The conserved cytoplasmic module of the transmembrane chemoreceptor McpC mediates carbohydrate chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 47:1353-1366.

**Le Moual, H., and D. E. Koshland, Jr.** (1996). Molecular evolution of the C-terminal cytoplasmic domain of a superfamily of bacterial receptors involved in taxis. *J. Mol. Biol.* 261:568-585.

**Macnab, R.M., and D.E. Koshland Jr** (1972). The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69 pp. 2509–2512.

**Magnuson, R., J. Solomon and A.D. Grossman** (1994), Biochemical and genetic characterisation of a competence pheromone from *Bacillus subtilis*. *Cell* 77, pp. 207–216.

**Moreno, M. S., B. L. Schneider, R. R. Maile, W. Weyler, and M. H. Saier, Jr.** (2001). Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol. Microbiol.* **39**:1366-1381.

**Muff, T.J. and G.W. Ordal** (2007). The CheC phosphatase regulates chemotactic adaptation through CheD, *J. Biol. Chem.* 282, pp. 34120–34128.

**Muller, J., S. Schiel, G. W. Ordal, and H. H. Saxild**(1997). Functional and genetic characterization of *mcpC*, which encodes a third methyl-accepting chemotaxis protein in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 143:3231-3240.

**Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita & A. Yamaguchi** (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419, 587-593

**Park, S.-Y., Lowder, B., Bilwes, A. M., Blair, D. F., Crane, B. R.** (2006). Structure of FliM provides insight into assembly of the switch complex in the bacterial flagella motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 11886-11891

**Park, S.Y., P. P. Borbat, G. Gonzalez-Bonet, J. Bhatnagar, A. M. Pollard, J. H. Freed, A. M. Bilwes & B. R Crane** (2006). Reconstruction of the chemotaxis receptor-kinase assembly, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, pp. 400–407.

**Rauprich, O., M. Matsushita, C.J. Weijer, F. Siegert, S.E. Esipov and J.A. Shapiro,** (1996) Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development. *J Bacteriol* 178, pp. 6525–6538.

**Rosario, M. M., J. R. Kirby, D. A. Bochar, and G. W. Ordal** (1995). Chemotactic methylation and behavior in *Bacillus subtilis*: role of two unique proteins, CheC and CheD. *Biochemistry* 34:3823-3831.

**Rosario, M.M., and G.W. Ordal** (1996), CheC and CheD interact to regulate methylation of *Bacillus subtilis* methyl-accepting chemotaxis proteins, *Mol. Microbiol.* 21, pp. 511–518.

**Szurmant, H., M. W. Bunn, V. J. Cannistraro, and G. W. Ordal** (2003). *Bacillus subtilis* hydrolyzes CheY-P at the location of its action, the flagellar switch. *J. Biol. Chem.* **278**:48611-48616.

**Szurmant, H., T. J. Muff and G. W. Ordal** (2004). *Bacillus subtilis* CheC and FliY are members of a novel class of CheY-P-hydrolyzing proteins in the chemotactic signal transduction cascade, *J. Biol. Chem.* 279, pp. 21787–21792.

**Szurmant, H., and G. W. Ordal** (2004). Diversity in Chemotaxis Mechanisms among the Bacteria and Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 301-319

**Terahara, N., M. Fujisawa, B. Powers, T. M. Henkin, T. A. Krulwich, and M. Ito** (2006) An intergenic stem-loop mutation in the *Bacillus subtilis* ccpA-motPS operon increases motPS transcription and the MotPS contribution to motility. *J Bacteriol* 188:2701–2705.

**Thomas, D. R., Morgan, D. G. and DeRosier, D. J.** (1999) *Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(18), 10134-10139.

**Toker, A. S., and Macnab, R. M.** (1997). Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY. *J. Mol. Biol.* 273, 623–634

**Tsuge, K., Y. Ohata, and M. Shoda.** (2001). Gene *yerP*, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3566-3573.

**Vollenbroich, D., N. Mehta, P. Zuber, J. Vater, and R. M. Kamp** (1994). Analysis of surfactin synthetase subunits in *srfA* mutants of *Bacillus subtilis* OKB105. *J. Bacteriol.*; 176(2): 395–400.

**Werhane H., Lopez, P., Mendel, M., Zimmer, M., Ordal, G.W., and Márquez-Magaña, L.M.** (2004). The last gene of the *fla/che* operon in *Bacillus subtilis*, *ylxL*, is required for maximal  $\sigma^D$  function. *J. Bacteriol.* 186: 4025-4029.

**West, J. T., W. Estacio, and L. M. Márquez-Magaña.** (2000). Relative roles of the *fla/che*  $P_A$ ,  $P_{D-3}$ , and  $P_{sigD}$  promoters in regulating motility and *sigD* expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182:4841-4848.

**Wolfe, A. J., B. P. McNamara, and R. C. Stewart.** (1994). The short form of CheA couples chemoreception to CheA phosphorylation. *J. Bacteriol.* 176:4483-4491.

**Yakhnin, H., Pandit, P., Petty, T. J., Baker, C. S., Romeo, T. & Babitzke, P.** (2007). CsrA of *Bacillus subtilis* regulates translation initiation of the gene encoding the flagellin protein (*hag*) by blocking ribosome binding. *Mol Microbiol* 64, 1605–1620.

**Yasumura, A., Abe, S., Tanaka, T.** (2008). Involvement of Nitrogen Regulation in *Bacillus subtilis* *degU* Expression. *J. Bacteriol.* 190: 5162-5171

**Yeh, J. I., H. P. Biemann, G. G. Prive, J. Pandit, D. E. Koshland, Jr., and S. H. Kim.** (1996). High-resolution structures of the ligand binding domain of the wild-type bacterial aspartate receptor. *J. Mol. Biol.* 262:186-201.

**Zimmer, M. A., J. Tiu, M. A. Collins, and G. W. Ordal** (2000)., Selective methylation changes on the *Bacillus subtilis* chemotaxis receptor McpB promote adaptation, *J. Biol. Chem.* 275, pp. 24264–24272.